意蜂工蜂酸性磷酸酶的纯化及其酶学特性

江　琰[1], 刘克武[2*], 雷远成[2], 宋贤丽[2]
(1. 贵州科学院, 贵阳　550001; 2. 四川大学生命科学学院, 成都　610064)

摘要: 从意蜂 *Apis mellifera* 工蜂体内分离提纯酸性磷酸酶(ACPase, EC3.1.3.2), 并对其性质进行了研究。将工蜂酸性磷酸酶的初提物经分段盐析、DEAE-Sepharose FF 离子交换层析及 Sephadex G-200 凝胶过滤等纯化步骤, 得到经聚丙烯酰胺凝胶电泳为单一蛋白区带的酶液。提纯倍数为 77.24, 酶液比活力为 16.22 U/mg(对硝基苯磷酸二钠作底物)。利用凝胶过滤法测定酶的相对分子质量为 135 kD, SDS-PAGE 测定酶的亚基相对分子质量为 63.1 kD。酶的等电点为 4.46 和 4.79。非还原/还原(NR/R)单向、双向 SDS-PAGE 显示酶分子含有链内二硫键。对二级结构圆二色谱分析显示, 酶分子中 α-螺旋占13.84%, β-折叠占 25.68%, 无规则卷曲占 56.34%。氨基酸组成分析结果表明, 酸性磷酸酶约含有 507 个氨基酸残基, 富含门冬氨酸残基。

关键词: 意蜂工蜂; 酸性磷酸酶; 分离纯化; 性质
中图分类号: Q556　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2004)03-0310-06

Purification and characterization of acid phosphatase from the Italian honeybee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)

JIANG Yan[1], LIU Ke-Wu[2*], LEI Yuan-Cheng[2], SONG Xian-Li[2] (1. Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550001, China; 2. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Acid phosphatase (ACPase, EC3.1.3.2) was isolated and purified from the Italian honeybee, *Apis mellifera* L., and properties of the enzyme had been studied. Acid phosphatase was partially obtained from *A. mellifera* by homogenate, ammunium sulfate fractionation, chromatography with DEAE-sepharose FF and gel filtration with Sephadex G-200. The purified enzyme moved as a single electrophoretic band in PAGE. The purification multiple was 77.24, and the specific activity 16.22 U/mg with pNPP as its substrate. The molecular weight of ACPase was 135 kD determined with gel filtration and its subunit weight was 63.1 kD determined with SDS-PAGE. Isoelectric focusing study showed that pI values of the enzyme were 4.46 and 4.79. NR/R single and two dimensions SDS-PAGE indicated that the enzyme contained intrachain disulfide bond. Circular dichroism spectrum was investigated, and it was found that the proportion of α-helix, β-sheet and random coil in the enzyme was 13.84%, 25.68% and 56.34% respectively. Amino acid composition analysis showed that there were about 507 amino acids in the ACPase, with plenty of Asp.

Key words: *Apis mellifera*; acid phosphatase; isolation and purification; properties

磷酸酯键在活体细胞中具有非常重要的功能。它参与贮存和传递遗传信息, 运输化学能量, 调节酶活性和信号分子(Zaidi *et al*., 1989; Neel and Tonks, 1997)。磷酸酶能够作用于酯键并催化酯键断裂, 属磷酸水解酶亚类。依据磷酸酶的催化底物不同, 可将其进一步分为: 非特异性磷酸酶, 可以催化水解几乎所有的磷酸酯键; 蛋白磷酸酶, 以磷酸蛋白和磷肽为底物(Vincent *et al*., 1992)。非特异性磷酸酶基于它们作用的最适 pH 又可被分为碱性磷酸酶和酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACPase)。碱性磷酸酶和酸性磷酸酶可在新陈代谢过程中对磷酸根进行循环利用(Lohse *et al*., 1995)。

酸性磷酸酶是生物体内磷代谢的重要酶类。此酶首次在红细胞中发现, 除了参与磷酸酯的代谢外, 还参与代谢调节、能量转换以及信号传导等重要生命活动。临床上将血清中酸性磷酸酶水平变化作为诊断前列腺癌(尤其在转移至骨骼后)、骨骼疾病、血小板破坏过多、肺栓塞等疾病的重要指标(崔福生, 1981)。酸性磷酸酶存在于植物根的表皮或叶下表面, 或由根分泌到外部的介质中。在磷酸饥饿条件

作者简介: 江琰, 女, 1977 年生, 重庆人, 硕士, 主要研究方向为蛋白质化学, E-mail: jiangyan-aju@hotmail.com
* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 028-85418627, E-mail: liukewuscu@yahoo.com.cn
收稿日期 Received: 2003-06-12; 接受日期 Accepted: 2003-09-27

下，植物的形态解剖及生理生化方面都会发生一系列变化，酸性磷酸酶活性的升高也是一项重要变化（Barrett-Lennard and Greenway，1982；Sedenko and Zaitseva，1984；O'Connel and Grove，1985）。同时这种现象在微生物中也是存在的（Yoshida *et al*.，1987）。

酸性磷酸酶在自然界中分布很广，从低等生物到高等动植物以及人类肝脏、前列腺都发现有酸性磷酸酶的存在（Antanaitis and Aisen，1983；Andersson *et al*.，1984；Ketcham *et al*.，1985；Lau *et al*.，1987；LeBansky *et al*.，1992）。目前人们对这些生物组织中的酸性磷酸酶已有相当广泛的研究。但关于昆虫类特别是蜜蜂的酸性磷酸酶研究报道较少。我们对意蜂 *Apis mellifera* L.工蜂酸性磷酸酶的酶学特性进行了较全面的研究，该结果对于深入探讨蜜蜂各发育阶段代谢活动以及蜂产品的诱导调节机制具有重要意义。

1 材料、试剂和仪器

1.1 材料及试剂

意蜂活体工蜂采自成都市郊养蜂厂。DEAE-Sepharose FF、Sephadex G-200 和 Sephacryl S-300 为 Pharmacia 公司产品；对硝基苯磷酸二钠（pNPP）为 Merck 公司产品；丙烯酰胺和 β-巯基乙醇（ME）为 Sigma 公司产品；甲叉双丙烯酰胺和考马斯亮蓝 R_{250} 为 Fluka 公司产品；SDS-PAGE 中分子量标准蛋白为上海华舜生物工程有限公司产品；NR/R 双向电泳低分子量标准蛋白为 Pharmacia 公司产品。

1.2 仪器

圆二色谱测定采用 JASCO J-500C 型自动记录分光偏振仪。氨基酸分析采用日立 835-50 型氨基酸快速分析仪。紫外光谱分析采用 TU-1800 型紫外可见分光光度计。Beckmen Coulter 高速冷冻离心机，PHS-3B 雷磁精密 pH 计。

2 方法

2.1 酸性磷酸酶的分离纯化

2.1.1 酸性磷酸酶粗酶液的制备及分离纯化：酶的提取参考江琰等（2001）和陈素丽等（1997）的方法并略有改进。活体工蜂经匀浆，盐析，充分透析后即为粗酶液。

2.1.2 DEAE-琼脂糖凝胶柱层析：将上述粗酶液上 DEAE-Sepharose FF 柱（2.5 cm × 20 cm），用 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液（含 NaCl 0 ~ 0.5 mol/L）线性梯度洗脱，分别测定蛋白质含量及酸性磷酸酶的活性。合并酶活力较高的洗脱液，经聚乙二醇（PEG）20000 浓缩充分透析。

2.1.3 交联葡聚糖凝胶柱层析：取上述浓缩透析后的酶液上 Sephadex G-200 柱（1.8 cm × 60 cm），用 0.01 mol/ L HAc-NaAc 缓冲液洗脱，分别测定蛋白质含量及酸性磷酸酶的活性，合并酶活力较高的洗脱液，浓缩透析。纯化的酸性磷酸酶用于电泳及酶学性质测定。

2.1.4 酶活性测定：参照 Orlando 等（1993）方法。以 pNPP 为底物，以每小时催化释放 1 μmol/L 对硝基苯酚的酶量定义为 1 个活力单位。

2.1.5 蛋白质浓度测定：按照 Lowry 等（1951）方法进行。

2.1.6 纯度鉴定：参照何忠效和张树政（1999）中聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）方法，分离胶 7.5%，浓缩胶 3.75%；SDS-PAGE 的方法，分离胶 12%，浓缩胶 3%，垂直板型电泳，考马斯亮蓝 R_{250} 染色。

2.2 酸性磷酸酶相对分子质量的测定

2.2.1 表观相对分子质量测定：应用 Sephacryl S-300 柱（AKTA FPLC 系统）测定酸性磷酸酶的相对分子质量（张龙翔等，1981）。

2.2.2 亚基相对分子质量测定：采用 SDS-PAGE 测定蛋白质亚基相对分子质量。浓缩胶浓度为 3%，分离胶浓度为 12%，垂直板型电泳，考马斯亮蓝 R_{250} 染色。

2.3 酸性磷酸酶等电点的测定

按照夏其昌（1999）等电聚焦法，凝胶浓度为 7.5%，其中含 2% 的 Ampholine（pH 3.5 ~ pH 10）。

2.4 酸性磷酸酶的 NR/R 单向和双向 SDS-PAGE

2.4.1 NR/R 单向 SDS-PAGE：在 Laemmli（1970）方法的基础上进行，即两份同一样品分别经还原（含 β-巯基乙醇）和非还原（不含 β-巯基乙醇）的样品处理液在室温下处理 1 h，在同一块胶上进行 SDS-PAGE，并比较电泳结果。

2.4.2 NR/R 双向 SDS-PAGE：参考王洪睿等（1995）的方法进行，两相电泳均采用含有浓缩胶和分离胶的不连续电泳，浓缩胶浓度为 5%。电泳结束后用考马斯亮蓝 R_{250} 染色。

2.5 圆二色谱分析

参考孙崇荣和李玉民（1991）及鲁子贤等（1987）方法进行。按 Chen-Yang 法（Chen *et al*.，1974）处理圆二色谱数据，得出二级构象的百分含量。

2.6 氨基酸组成分析

用日立 835-50 型高速氨基酸分析仪测定。

3 结果

3.1 酸性磷酸酶的提纯

经 DEAE 柱层析洗脱后，可得多个蛋白峰和一个主要的酶活力峰。在经 Sephadex G-200 柱层析后，可得两个蛋白峰，其中只有一个蛋白峰表现出酸性磷酸酶活力。测定酶分离提纯各步的总蛋白、总活力，并据此计算比活、回收率和纯化倍数，结果见表 1。经各步分离纯化后，获得比活力 16.22，纯化倍数为 77.24 的酸性磷酸酶液。

表 1 意蜂工蜂酸性磷酸酶的纯化结果

Table 1 Purification of the ACPase extract from the Italian worker bee

纯化步骤 Purification step	总体积 Total volume (mL)	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (U)	比活 Specific activity (U/mg)	回收率 Yield (%)	纯化倍数 Purification multiple
匀浆 Homogenate	78	2 702.7	–	–	–	–
酸处理 Acid treatment	75	2 421.00	507.64	0.21	100	1.0
$(NH_4)_2SO_4$ 上清液 Saturated supernatant	60	1 794.10	402.00	0.22	82.02	1.05
$(NH_4)_2SO_4$ 盐析物 Salting-out $(NH_4)_2SO_4$	56	570.88	282.27	0.49	55.60	2.33
DEAE 柱层析 DEAE-Sepharose FF column	16	105.61	257.34	2.44	50.69	11.62
Sephadex G-200 柱层析 Sephadex G-200 column	5	12.25	198.75	16.22	39.15	77.24

3.2 酸性磷酸酶的纯度鉴定

由 Sephadex G-200 柱纯化的酶液经聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，用考马斯亮蓝 R_{250} 染色，均显现单一蛋白区带，证明该酶已达到电泳纯(图 1，图 2)。

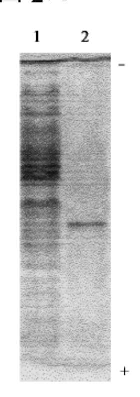


图 1 意蜂工蜂酸性磷酸酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 1 PAGE of ACPase in the Italian worker bee

1. 粗品 Homogenate; 2. 提纯后样品 Purified sample.

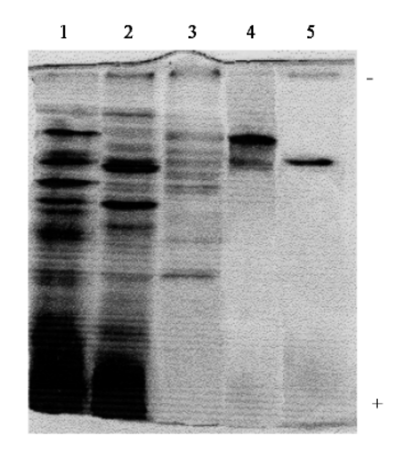


图 2 意蜂工蜂酸性磷酸酶的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of ACPase in the Italian worker bee

1. 匀浆后样品 Homogenate; 2. 酸处理后样品 Acid treatment fraction; 3. 盐析后样品 Salting-out fraction; 4. DEAE-Sepharose 柱洗脱后样品 DEAE-Sepharose fraction; 5. Sephadex G-200 柱提纯样品 Sephadex G-200 fraction.

3.3 酸性磷酸酶的相对分子质量测定

3.3.1 表观相对分子质量：用 Sephacryl S-300 柱(AKTA FPLC 系统)测定酸性磷酸酶的相对分子质量。凝胶柱床体积(V_t)为 120 mL，外水体积(V_o)为 43.43mL。酸性磷酸酶的洗脱体积(V_e)为 71.84 mL。计算有效分配系数(Kav)，根据标准曲线(图 3)计算酸性磷酸酶的相对分子质量为 135 kD。

3.3.2 亚基相对分子质量：经 SDS-PAGE 呈现为一条区带(图 4)，计算得出酸性磷酸酶的亚基相对分子质量为 63.1 kD。

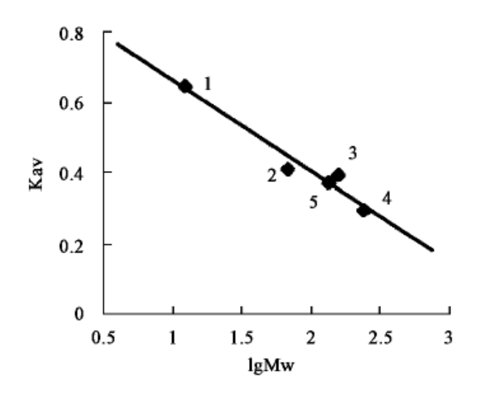


图 3　凝胶过滤测定酸性磷酸酶的相对分子质量

Fig. 3　Molecular weight determination of ACPase on sephacryl S-300

1. 细胞色素 Cytochrome, 12.5 kD; 2. 卵清蛋白 Albumin, 68 kD; 3. 醛缩酶 Aldolase, 158 kD; 4. 过氧化物酶 Katalase, 240 kD; 5. 酸性磷酸酶 ACPase.

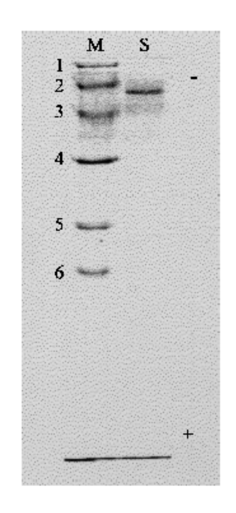


图 4　意蜂工蜂酸性磷酸酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 4　SDS-PAGE of ACPase in the Italian worker bee

M: 标准蛋白 Marker; S: 酸性磷酸酶样品 ACPase sample; 1. 磷酸化酶 b Phosphorylase b (94 kD); 2. 牛血清白蛋白 Albumin (67 kD); 3. 卵清蛋白 Ovalbumin (43 kD); 4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (30 kD); 5. 胰蛋白酶抑制剂 Trypsin inhibitor (20.1 kD); 6. α-乳清蛋白 α-lactalbumin (14.4 kD).

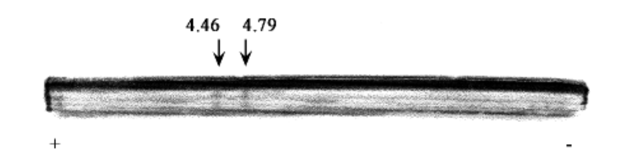


图 5　意蜂工蜂酸性磷酸酶的等电聚焦电泳

Fig. 5　Isoelectric focusing of ACPase in the Italian worker bee

3.4　酸性磷酸酶的等电点

经盘状等电聚焦电泳，考马斯亮蓝 R_{250} 染色后呈现出两条区带(图 5)，由标准曲线得出酸性磷酸酶的等电点 pI 值为 4.79 和 4.46。

3.5　酸性磷酸酶的 NR/R 单向 SDS-PAGE

将两份同一酸性磷酸酶样品经还原和非还原处理后，在同一块胶上进行 SDS-PAGE。由图 6 可见，经非还原处理后的样品较还原处理后的样品迁移距离更大，表明其分子内含有二硫键。

3.6　酸性磷酸酶的 NR/R 双向 SDS-PAGE

酸性磷酸酶的 NR/R 双向 SDS-PAGE 见图 7。由图 7 可见，牛血清白蛋白因分子内有链内二硫键而位于对角线上方；酸性磷酸酶样品位于对角线上方，因此也含有链内二硫键。

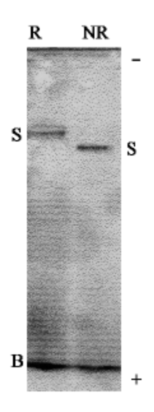


图 6　意蜂工蜂酸性磷酸酶的 NR/R SDS-PAGE 图谱

Fig. 6　NR/R SDS-PAGE of ACPase in the Italian worker bee

NR: 非还原 Non-reductive; R: 还原 Reductive; S: 样品 Sample; B: 溴酚蓝前沿 Brochlorophenol blue.

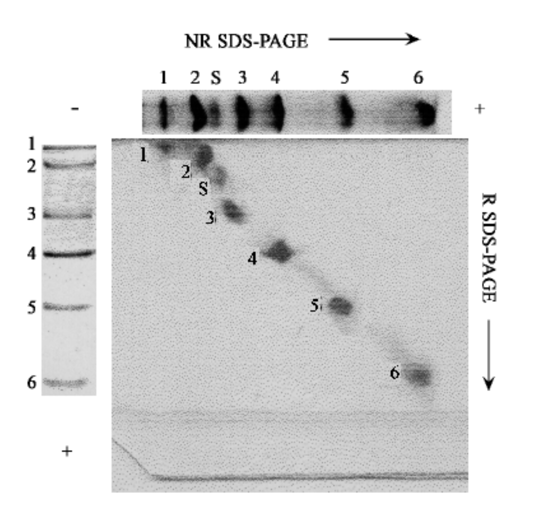


图 7　酸性磷酸酶的 NR/R 双向 SDS-PAGE 图谱

Fig. 7　NR/R two-dimensional SDS-PAGE of ACPase in the Italian worker bee

1. 磷酸化酶 Phosphorylase b (94 kD); 2. 牛血清白蛋白 Albumin (67 kD); 3. 卵清蛋白 Ovalbumin (43 kD); 4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (30 kD); 5. 胰蛋白酶抑制剂 Trypsin inhibitor (20.1 kD); 6. α-乳清蛋白 α-Lactalbumin (14.4 kD); S: 样品 Sample.

3.7 酸性磷酸酶的圆二色谱分析结果

图 8 为酸性磷酸酶的圆二色谱图谱，可见酸性磷酸酶样品在 210 nm 有一负峰，214 nm 和 221 nm 附近各有一组较小的肩峰。按 Chen-Yang 法（Chen *et al.*，1974）可计算出，酸性磷酸酶中含有 α-螺旋 13.84%，β-折叠 25.68%，无规则卷曲 56.34%。

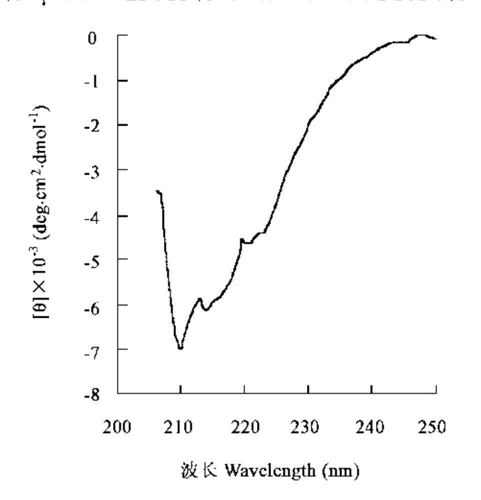


图 8 意蜂工蜂酸性磷酸酶的圆二色谱图谱

Fig. 8 Circular dichroism spectrum of ACPase in the Italian worker bee

3.8 酸性磷酸酶的氨基酸组成

由表 2 可见，酸性磷酸酶由约 507 个氨基酸残基（Trp 除外）组成，其中门冬氨酸含量最高（注：色氨酸未作测定），异亮氨酸含量也较高，缬氨酸和甲硫氨酸相对较少。

表 2 意蜂工蜂酸性磷酸酶的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of ACPase in the Italian worker bee

氨基酸 Amino acid	含量 Contents (mg/100 g)	残基数 Residue number	氨基酸 Amino acid	含量 Contents (mg/100 g)	残基数 Residue number
Asp	11	52	Ile	7.1	34
Thr	5.9	31	Leu	9.4	45
Ser	4.9	29	Tyr	4.3	15
Glu	8.4	36	Phe	6.2	24
Gly	5.3	45	Lys	8.4	36
Ala	6.0	42	His	3.4	14
Val	2.3	12	Arg	6.0	22
Cys	7.1	38	Pro	3.6	20
Met	2.9	12	Total	102.2	507

注：Trp 被 HCl 水解未被检测到。

Note: The sample was hydrolyzed by HCl, and Trp was destroyed, so no Trp was detected.

4 讨论

酸性磷酸酶是来自基因结构不同的一组同工酶：前列腺酸性磷酸酶、溶酶体酸性磷酸酶、红细胞酸性磷酸酶和巨噬细胞酸性磷酸酶。在本实验过程中，Sephadex G-200 柱洗脱有 2 个蛋白峰，其中一个有酸性磷酸酶活性，初步判断工蜂体内酸性磷酸酶无同工酶。酸性磷酸酶分为高分子量酸性磷酸酶和低分子量酸性磷酸酶，是基于其在催化过程中形成磷酸酶蛋白中间过渡体时，磷酸化位点的不同而区分的。其分子大多含有两个分子量相同的亚基（Orlando *et al.*，1993）。本实验分离的酸性磷酸酶相对分子质量为 135 kD，亚基相对分子质量 63.1 kD，推测该酶含有两个分子量相同的亚基。已往研究表明，酸性磷酸酶多为单个离子结合的糖蛋白（Vincent and Averill，1990；Ek-Rylander *et al.*，1991），pI 值一般在 4.5 ~ 7.0 范围（Zhang and van Etten，1990；Wannet *et al.*，2000）。本实验分离到的工蜂酸性磷酸酶有两个 pI 值，说明该酸性磷酸酶也为一种糖蛋白。江琰和刘克武（2003）研究结果表明半胱氨酸为工蜂酸性磷酸酶的功能基团。我们采用 20 世纪 70 年代发展起来的 NR/R 单向、双向对角线 SDS-PAGE 的方法，直观的分析出酸性磷酸酶分子内存在链内二硫键。这一结果将有助于进一步研究半胱氨酸残基在酶分子内的空间构象及酶分子的立体结构。

目前对酸性磷酸酶的研究已较为普遍，但对其二级结构的研究报道较少。陈江野等（1990）运用 Chou 与 Fasman 方法编制的程序分析酵母酸性磷酸酶圆二色谱，并推测其二级结构中 α-螺旋、β-折叠及无规则卷曲的比例关系，发现酸性磷酸酶中无规则卷曲所占比例最大，在 50% 以上。我们用 Chen-Yang 法对意蜂工蜂酸性磷酸酶圆二色谱分析，推测酶分子的二级结构也获得同样结果。

参 考 文 献 （References）

Andersson G, Ek-Rylander B, Hammarström LE, 1984. Purification and characterization of a vanadate-sensitive nucleotide tri- and diphosphatase with acid pH optimum from rat bone. *Arch. Biochem. Biophys.*, 228: 431 – 438.

Antanaitis BC, Aisen P, 1983. Uteroferrin and the purple acid phosphatases. *Adv. Inorg. Biochem.*, 5: 111 – 134.

Barrett-lennard EG, Greenway H, 1982. Partial separation and characterization of soluble phosphatases from leaves of wheat and rice seedings. *Soil Science Plant Nutrition*, 28: 542 – 552.

Chen JY, Zhang Y, Ao SZ, Lu ZX, 1990. Prediction and comparison of

secondary structures for acid phosphatase polypeptides P56，P57，P60 in yeast. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*，22（1）：87 – 90. [陈江野，张鹰，敖世洲，鲁子贤，1990. 酵母酸性磷酸酯酶多肽 P56，P57 和 P60 二级结构的预测与比较. 生物化学与生物物理学报，22（1）：87 – 90]

Chen SL，Chen QX，Hu TH，Gong L，Yan SX，1997. Purification and properties of acid phosphatase from *Penaeus penicillatus*（Alcock），*Journal of Xiamen University*（*Natural Science*），36（1）：121 – 125. [陈素丽，陈清西，胡天惠，公磊，颜思旭，1997. 长毛对虾酸性磷酸酶的纯化与性质. 厦门大学学报（自然科学版），36（1）：121 – 125]

Chen YH，Yang JT，Chau KH，1974. Determination of the helix and form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry*，13（6）：3 350 – 3 359.

Cui FS，1981. The Examining Methods of Medical Biochemistry. Tianjin: Tianjin Science Technology Press. 276 – 278. [崔福生，1981. 医用生化检验手册. 天津：天津科学技术出版社. 276 – 278]

Ek-Rylander B，Bergman T，Andersson G，1991. Characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase（ATPase）from rat bone: hydrodynamic properties and N-terminal amino acid sequence. *J. Bone Miner. Res.*，6：365 – 373.

He ZX，Zhang SZ，1999. PAGE. Beijing: Science Press. 11 – 50. [何忠效，张树政，1999. 电泳. 北京：科学出版社. 11 – 50]

Jiang Y，Liu KW，Yang SZ，Zhong HY，Wei W，Zhao XP，Liu XW，Min LE，Zhang B，Yu D，2001. Isolation，purification and characterization of acid phosphatase from *Apis cerana*. *J. Sichuan Univ.*（*Nat. Sci.*），38（5）：776 – 780. [江琰，刘克武，杨守忠，张洪洲，魏炜，赵欣平，刘晓雯，闵丽娥，张斌，喻东，2001. 意蜂工蜂酸性磷酸酶的分离纯化及动力学研究. 四川大学学报（自然科学版），38（5）：776 – 780]

Jiang Y，Liu KW，2003. Chemical modification and fluorescence spectrum of acid phosphatase from *Apis cerana*. *Chemical Research and Application*，15（5）：658 – 660. [江琰，刘克武，2003. 意蜂工蜂酸性磷酸酶的化学修饰及荧光光谱研究. 化学研究与应用，15（5）：658 – 660]

Ketcham CM，Baumbach GA，Bazer FW，Roberts RM，1985. The type 5，acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia. Purification，properties，immunological characterization，and comparison with porcine uteroferrin. *J. Biol. Chem.*，260：5 768 – 5 776.

Laemmli UK，1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*，227：680 – 685.

Lau KH，Freeman TK，Baylink DJ，1987. Purification and characterization of an acid phosphatase that displays phosphotyrosyl-protein phosphatase activity from bovine cortical bone matrix. *J. Biol. Chem.*，262：1 389 – 1 397.

LeBansky BR，McKnight TD，Griffing LR，1992. Purification and characterization of a secreted purple acid phosphatase from soybean suspension cultures. *Plant Physiol.*，99：391 – 395.

Lohse DL，Denu JM，Dixon JE，1995. Insights derived from the structures of the Ser/Thr phosphatases calcineurin and protein phosphatase 1. *Structure*，3：987 – 990.

Lowry OH，Rosebrough NJ，Farr AL，Randall RJ，1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.*，193：265 – 275.

Lu ZX，Cui T，Shi QL，1987. Application of Circular Dichroism and Rotatory Dispersion in Molecular Biology. Beijing: Science Press. 74 – 122. [鲁子贤，崔涛，施庆洛，1987. 圆二色性和旋光色散在分子生物学中的应用. 北京：科学出版社. 74 – 122]

Neel BG，Tonks NK，1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.*，9（2）：193 – 204.

O'Connell AM，Grove TS，1985. Acid phosphatase activity in Karri（*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.）in relation to soil phosphate and nitrogen supply. *J. Exp. Bot.*，36：1 359 – 1 372.

Orlando JL，Zirino T，Quirk BJ，Averill BA，1993. Purification and properties of the native form of the purple acid phosphatase from bovine spleen. *Biochemistry*，32：8 120 – 8 129.

Sedenko DM，Zaitseva MG，1984. The activity of phosphatases in wheat roots in relation to plant supply with phosphorus. *Fiziol. Rast.*，31：146 – 152.

Sun CR，Li YM，1991. Study of Protein Chemistry. Shanghai: Fudan University Press. 159 – 167. [孙崇荣，李玉民，1991. 蛋白质化学导论. 上海：复旦大学出版社. 159 – 167]

Vincent JB，Averill BA，1990. An enzyme with a double identity: purple acid phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase. *FASEB J.*，4：3 009 – 3 014.

Vincent JB，Crowder MW，Averill BA，1992. Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.*，17：105 – 110.

Wang HR，Zhang T，Wang ZF，Wang XC，Zhou HM，1995. There is no any disulfide bond in N-Acylamino acid amido hydrolase. *Science in China*（*Series B*），25（1）：54 – 59. [王洪睿，张彤，王泽峰，王希成，周海梦，1995. 氨基酰化酶分子中并不存在二硫键. 中国科学（B 辑），25（1）：54 – 59]

Wannet WJB，Wassenaar RW，Jorissen HJMM，van der Drift C，Op den Camp HJM，2000. Purification and characterization of an acid phosphatase from commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Antonie van Leeuwenhoek*，77：215 – 220.

Xia QC，1999. Research and Progress of Protein Chemistry. Beijing: Science Press. 113 – 116. [夏其昌，1999. 蛋白质化学研究技术与进展. 北京：科学出版社. 113 – 116]

Yoshida K，Kuromitsu Z，Ogawa N，1987. Phosphate metabolism and cellular regulation. In: Torriani-Gorini A，Rothman FG，Silver S，Wright A，Yagil E eds. Microogranisms. ASM，Washington DC. 48 – 55.

Zaidi M，Moonga B，Moss DW，MacIntyre I，1989. Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*，159：68 – 71.

Zhang LX，Zhang TF，Li LY，1981. Methods and Technology of Experiment of Biochemistry. Beijing: People's Education Press. 116 – 123. [张龙翔，张庭芳，李令媛，1981. 生化实验方法和技术. 北京：人民教育出版社. 116 – 123]

Zhang ZY，van Etten RL，1990. Purification and characterization of a low-molecular-weight acid phosphatase-a phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart. *Arch. Biochem. Biophys.*，282（1）：39 – 48.

（责任编辑：黄玲巧）